Aus der Medizinischen Klinik der Universität Göttingen
Direktor: Professor Dr. H. Straub

Retikulozytenreaktion bei Ratten nach Verabfolgung von Pterinen

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt am 15. September 1937

von

Franz Kramer

aus Sudenfeld (Teutoburger Wald)

GÖTTINGEN 1938

BUCHDRUCKEREI FERDINAND PIEPER / WEENDE-GÖTTINGEN

Dekan: Prof. Dr. Krantz
Berichterstatter: Dozent Dr. Wolf
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Straub

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 1938

Im Jahre 1926 gaben zwei Amerikaner, Minot und Murphy[1], die Lebertherapie als diätetisches Behandlungsverfahren bei der perniziösen Anämie bekannt. Seitdem hat die perniziöse Anämie ihren Schrecken für die Menschheit verloren. Es gibt praktisch keine leberrefraktäre perniziöse Anämie.

Den Ausgangspunkt für die Lebertherapie Minots und Murphys bildeten umfangreiche Untersuchungen von Whipple und Robscheit-Robbins. Sie machten Hunde durch ausgiebige Aderlässe anämisch und untersuchten dann, bei welcher Kost die Hämoglobinregeneration am schnellsten eintrat. Bei diesen Versuchen fanden sie Rindsleber am wirksamsten. Wir erkennen hier also die Leber als ein Mittel gegen eine sekundäre Anämie.

Aus einer ganz falschen Theorie heraus, — denn die sekundäre Anämie hat wohl mit der perniziösen Anämie außer dem Symptom „Anämie", was auch hier wiederum aus einer ganz anderen Ätiologie heraus zu werten ist, nichts gemeinsam —, versuchten Minot und Murphy dennoch die Lebertherapie bei der perniziösen Anämie. Die Lebertherapie war ein großer Erfolg. Man kann es als Glück für die Menschheit bezeichnen, daß die Leber ein Produkt speichert, das bei der perniziösen Anämie wirksam ist. Es ist aber unwahrscheinlich, daß dieser bei der perniziösen Anämie wirksame Leberstoff derselbe ist, der die schnelle Hämoglobinregeneration bei entbluteten Hunden bewirkt. So ist z. B. auch Fischleber bei der perniziösen Anämie wirksam, hat aber bei der Entblutungsanämie keine Wirkung[2]. Die bei der perniziösen Anämie nicht oder auf die Dauer nicht wirksamen Knochenmarkreizmittel wie Eisen, Kupfer und Arsen sind heute die besten Heilmittel bei der sekundären Anämie.

Durch die Lebertherapie erzielen wir bei der perniziösen Anämie anscheinend die Aufhebung einer Knochenmarksperre. Das hypertrophische Knochenmark, das nicht fähig ist, normale Blutzellen in genügender Anzahl zu bilden (Morawitz und Denecke[3]), fängt nach der Leberverabfolgung wieder an, normale Blutzellen auszuschütten. Nach und nach verschwinden die an embryonale Blutzellen erinnernden Elemente aus dem Blut.

Als erstes Zeichen der Wirksamkeit der Leber sehen wir im Blut vermehrt Retikulozyten auftreten. Danach steigen die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten an. Diese Retikulozytenkrise beim Perniziosakranken ist wichtig als Test bei dem Versuch der Reindarstellung der wirksamen Substanz der Leber, „des Antiperniziosaprinzips“[4].

Nun zeigt aber auch der gesunde Mensch und das Tier eine Retikulozytenkrise nach Verabfolgung von Leber. Aber diese Retikulozytenkrise ist keine Antwort auf das Antiperniziosaprinzip und kann daher auch nicht als Test dafür gewählt werden. Wir müssen die Retikulozytenkrise beim Gesunden und beim Tier vielmehr als einen Knochenmarkreiz auffassen, bewirkt durch knochenmarkreizende Mittel, die noch neben dem Antiperniziosaprinzip in der Leber vorhanden sind. Wahrscheinlich sind es dieselben Stoffe, die bei der Entblutungsanämie der Hunde die schnelle Hämoglobinregeneration machen. Die tierexperimentelle Retikulozytenkrise ist also kein Antiperniziosatest, kann aber vielleicht als Test für einen Knochenmarkreiz gewertet werden.

Retikulozytenkrise bedeutet einen Anstieg der Retikulozyten im strömenden Blut. Retikulozyten sind rote Blutkörperchen, in deren Zelleib nach supravitaler Färbung eine netz- oder körnchenartige Struktur nachzuweisen ist. Es gilt heute als bewiesen, daß die Retikulozyten jugendliche Erythrozyten sind. Heilmeyer[5] konnte die Reifung überlebender Retikulozyten zu Erythrozyten in vitro feststellen. Er unterscheidet nach der Dichte des Netzwerkes, die er als Kriterium der Reife deutet, vier Gruppen von Retikulozyten von vollkommen unreifen Formen mit einem dichten Netzwerk (Gruppe I) bis zu fast zu Erythrozyten ausgereiften Formen mit nur noch einigen Körnchen (Gruppe IV). In der Blutbahn sollen nur noch die reiferen Formen der Gruppe III und IV vorkommen. Nach Heilmeyer verlassen nur Retikulozyten die erythropoetischen Werkstätten des Knochenmarks, um erst in der Blutbahn zu definitiven Erythrozyten auszureifen. Zur Begründung dieser Hypothese hat Heilmeyer aus der Anzahl der Retikulozyten und ihrer Reifungsdauer den Blutmauserungsindex berechnet. Er kam zu Werten, die schon Terven und Heilmeyer[6] aus der Menge der aus dem Abbau der Erythrozyten freiwerdenden Endprodukte des Farbenkomplexes Hämoglobin der im Stuhl und Urin ausgeschiedenen Stoffe Urobilin und Urobilinogen errechnet haben. Ferner sprechen die Versuche Istomanovas[7], der im Knochenmark nur Retikulozyten gefunden haben will, für diese Hypothese. Auch treten bei Krankheiten, die mit vermehrtem Erythrozytenzerfall einhergehen z. B. beim hämolytischen Ikterus, als Beweis der Kompensationsarbeit des Knochenmarks viele Retikulozyten auf. Fast beweisend ist die Tatsache, daß Riddle[8] die

Höhe der nach optimaler Verabfolgung von Leberextrakten auftretenden Retikulozytenkrise aus Relationen zwischen vorhandener Erythro- und Retikulozytenzahl im voraus berechnen konnte. Das allerdings nur unter der Voraussetzung, daß alle Erythrozyten erst im strömenden Blut durch Reifung der Retikulozyten entstehen.

Nach diesen Ausführungen bedeutet die Retikulozytenkrise eine Ausschüttung von jugendlichen Erythrozyten aus dem Knochenmark, und die tierexperimentelle Retikulozytenkrise beim gesunden Tier kann als Test für eine knochenmarkreizende Wirkung der zu untersuchenden Stoffe gelten.

Eine Retikulozytenkrise wird verursacht nicht nur durch Leberverabreichung sondern auch durch Eisen, Kupfer, Arsen, durch die Kombination von Tryptophan und Histidin[9] und die Kombination von Oxyprolin und Oxyglutaminsäure[10]. Seyderhelm und Grebe[11] wollen eine Retikulozytose nach Verabfolgung von Vitamin C, B_2 und D festgestellt haben. Hans Scheerer[12] stellte eine solche nach Verabfolgung der Inkrete des Hypophysenvorderlappens, der Schilddrüse und der Nebennieren fest. Die letztgenannten Inkrete scheinen allerdings nur eine vermehrte Ausschwemmung der Retikulozyten aus dem Knochenmark zur Folge zu haben, da die Krise schon nach einigen Stunden auftrat.

Möglicherweise sind einige der erwähnten Stoffe zur Erythropoese nötig, und man kann sich vorstellen, daß sie in großen Gaben eine Mehrarbeit der hämatopoetischen Werkstätten bewirken, wenn auch die perniziöse Anämie nicht auf den Mangel dieser Stoffe beruht.

Beachtenswert ist eine neuere Arbeit von Subbarow und Jakobson[13], denen die Reindarstellung von zwei Stoffen aus der Leber gelungen ist, die beim Meerschweinchen retikulogenetisch wirken. Der eine Teilstoff hat sich mit dem l-Tyrosin identisch erwiesen. Auch das käufliche l-Tyrosin ergab beim Meerschweinchen dieselbe biologische Reaktion. Es wurde auch festgestellt, daß 50 % der retikulogenetischen Wirksamkeit von rohem Leberauszug auf das l-Tyrosin zurückgeführt werden konnte. Zur Trennung des verbleibenden biologisch wirksamen Stoffes wurde eine größere Menge rohen Leberauszuges als Ausgangsmaterial genommen. Dieser Auszug wurde verdünnt, von Holzkohle aufgesogen und mit Äthylalkohol gereinigt. Bei Sättigung des gereinigten Stoffes sonderte sich ein weißer, körniger Bestandteil aus. Von diesem Stoff wurden auf 100 g frischer Leber 2 mg erhalten. Der Stoff war schon in homöopathischen Dosen beim Meerschweinchen wirksam. Er hat sich als komplexes Purin und der Pterinreihe ähnlich erwiesen, wie sie von Wieland und Schöpf[14] beschrieben und aus den Flügeln gelber Schmetterlinge hergestellt ist.

Nun hat Koschara[15] aus dem Menschenharn einen Farbstoff isoliert, der in allen wesentlichen Punkten mit dem Xanthopterin, dem gelben Farbstoff des Zitronenfalterflügels, übereinstimmt. Er hat diesen Farbstoff als Uropterin bezeichnet. Dieses von Koschara hergestellte Uropterin ist von Tschesche und Wolf[16] auf seine antianämischen Eigenschaften geprüft worden. Als Test wurden einseitig mit Ziegenmilch ernährte junge Ratten, die danach eine Anämie bekamen, gewählt. Es zeigte sich, daß nach Verabfolgung von 1 Gamma Uropterin pro Tag und Tier die Erythrozytenzahl in 14 Tagen um 2 bis 3 Millionen anstieg.

Die knochenmarkreizende Wirkung des Uropterins und auch anderer Pterine soll nun an den im Test der Rattenretikulozytenreaktion gewonnenen Ergebnissen gezeigt werden. Dabei war von vornherein nicht mit einer Erfassung des Antiperniziosastoffes zu rechnen. Dagegen versprach die Prüfung die Feststellung einer knochenmarkreizenden Wirkung der Pterine.

Gewählt wurden ältere, gesunde, vorwiegend weiße Ratten, meistens mit einem Gewicht von etwa 200 g. Die Tiere wurden isoliert untergebracht. Alle drei oder vier Tage wurden die Käfige mit frischer Holzwolle versehen. Die Nahrung der Ratten bestand vor und während des Versuches aus Brotabfällen und Milch. Die Blutentnahme erfolgte durch Abschneiden des Schwanzes. Die Zahl der Retikulozyten und der roten Blutkörperchen insgesamt wurden bestimmt. In den meisten Versuchen wurde auch der Hämoglobinwert festgestellt. Ferner wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert.

Zur Vitalfärbung der Retikulozyten wurde ein Tröpfchen Blut mit derselben Menge Brillantkresylblaulösung (1 g auf 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung) auf dem Objektträger vermischt und ein Ausstrich gemacht. Das so gewonnene Präparat bringt man 20 Minuten in einer feuchten Kammer unter. Danach läßt man das Präparat gründlich trocknen und fixiert und färbt nach May-Grünwald. Die Auszählung erfolgt mit Hilfe eines Gitterokulars. Man zählt auf 2 oder 3 verschiedenen Stellen des Präparats je 1000 Erythrozyten und die darin enthaltenen Retikulozyten aus und bestimmt den Promillsatz der Retikulozyten.

Ganz allgemein sei bemerkt, daß einige Ratten von vornherein eine hohe Retikulozytenzahl etwa bis 50 Promill aufwiesen. Die Ratten wurden für den Versuch nicht gewählt. Ebenso waren bei nährenden weiblichen Ratten die Retikulozyten vermehrt. Auch sonst konnten bei den Tieren, die lediglich als Kontrolle dienten und bei denen die Retikulozytenwerte in den gleichen Intervallen wie bei den Versuchstieren bestimmt wurden, Schwankungen der Retikulozytenzahl festgestellt werden. Bei der hier angegebenen Methode der Blutentnahme und Ernährung schwankten die Retikulozyten zwischen

6 Promill und 30 Promill. Die Werte stiegen während einer 40 Tage dauernden Untersuchung nie höher. Junge Tiere antworteten nach Verabfolgung von Pterinen und Leberextrakten mit einer höheren Retikulozytose als alte. Die Pterine wurden subcutan verabfolgt. Im ganzen wurden Versuche an 35 Ratten durchgeführt.

Abb. 1 zeigt 2 Kurven, die über die retikulogenetische Wirksamkeit des Xanthopterins aussagen. Es ist schon erwähnt, daß dieser Stoff zuerst von Wieland und Schöpf aus dem Zitronenfalterflügel gewonnen ist. Hernach ist er von Schöpf und Becker[17] näher untersucht. Schöpf und Becker[18] haben für diesen Stoff die Formel $C_{19}H_{18}O_6N_{16}$ angegeben. In neuester Zeit ist das Xanthopterin von Tschesche[19] als bisher einziges mit Sicherheit in der Leber vorkommendes Pterin nachgewiesen.

Abb. 1, Kurve 2 zeigt eine Retikulozytenkrise nach Verabfolgung von 150 Gamma rohem Xanthopterin. Der Pfeil bedeutet den Tag der Injektion. Am 5. Tag sind die Retikulozyten deutlich angestiegen. Am 12. Tag nach der Injektion befinden sich 75 Promill Retikulozyten im strömenden Blut. In einem cmm Blut sind am 12. Tag 609000 Retikulozyten enthalten, dagegen vor der Injektion nur 133000. Vom 12. Tage ab geht die Anzahl der Retikulozyten wieder zurück. Dann erfolgt am 20. Tage nochmals eine Krise. Diese Spätreaktion ist nach Verabfolgung fast aller Pterine beobachtet. Es war daran zu denken, daß sie auf eine Kompensationsarbeit des Knochenmarks nach dem durch Abschneiden des Schwanzes entstehenden Blutverlust zurückzuführen sei. Aber die Kontroll-Tiere zeigen keine Spätreaktion. Ebenso waren nach Verabfolgung von 150 Gamma Xanthopterin bei nur zweimaliger Blutentnahme am 5. und am 20. Tag nach der Injektion die Retikulozyten sowohl am 5. als auch am 20. Tag stark vermehrt.

Die Kurve 1 Abb. 1 zeigt eine Retikulozytenkrise nach Verabfolgung von 150 Gamma reinem Xanthopterin. Der Anstieg der Retikulozyten setzt deutlich am 2. Tag nach der Injektion ein. Am 5. Tag ist die Zahl der Vitalgranulierzen auf 64 Promill gestiegen, während die Zahl der Erythrozyten im ganzen abgenommen hat. Vor der Injektion sind in einem cmm Blut 228000 = 16 Promill, am 5. Tag nach der Injektion 496000 = 64 Promill und am 20. Tag 550800 = 98 Promill Retikulozyten enthalten.

Das Absinken der Erythrozytenzahl nach der Injektion ist in den meisten Fällen beobachtet worden. Es findet also während der vermehrten Bildung der jugendlichen roten Blutkörperchen ein entsprechend größerer Abbau der reifen Erythrozyten statt.

Abb. 2 zeigt die Retikulozytenkrise nach Verabfolgung von 20 Gamma Uropterin. Uropterin stimmt chemisch in allen Eigenschaften mit dem Xanthopterin überein. Auch die biologische Wirkung ist

fast dieselbe. Die Retikulozyten stiegen von 117000 im cmm = 18 Promill auf 793000 = 130 Promill nach 10 Tagen an. Nach anfänglichem Sinken steigt die Zahl der Retikulozyten am 5. Tag deutlich an.

Abb. 3 zeigt die biologische Wirkung des Leukopterins. Es wurden 150 Gamma verabfolgt. Leukopterin ist das weiße Pigment des Kohlweißlings. Es ist von Wieland, Metzger, Schöpf und Bülow[20] beschrieben mit der Formel $C_{19}H_{19}O_2N_{15}$. Die Retikulozytenkrise beginnt am 3. Tag. Am 20. Tag ist eine Spätreaktion beobachtet.

Ganz ähnlich ist die Wirkung des Guanopterins (Abb. 4), eines aus dem Guano hergestellten Pterins. Es wurden 150 Gamma subcutan injiziert.

Abb. 5 zeigt die biologische Wirkung des Erythropterins, eines roten Farbstoffes aus Schmetterlingsflügeln. Auch hier sind 150 Gamma injiziert.

Auf Pernämyl reagierten die Ratten ganz ähnlich. Es trat eine Früh- und Spätreaktion auf; aber die Retikulozytenkrise zeigte nicht so hohe Werte. Es sind ferner Versuche mit Laktoflavin durchgeführt. Laktoflavin war im Milch-Anämietest nicht wirksam. Es zeigte im Test der Rattenretikulozytenreaktion nur eine Spätreaktion.

Wir sahen nach Pterininjektion regelmäßig ausgesprochene Retikulozytenkrisen, und zwar ständig eine Frühreaktion und in den meisten Fällen eine deutliche Spätreaktion. Nur in einem Fall (Abb. 2) zeigt die Spätreaktion einen geringen Wert. Eine Frühreaktion ist von Singer[21] bei Ratten nach Injektionen von Leberpräparaten und Magensaft beschrieben. Singer sah den Beginn einer solchen 2 bis 3 und spätestens 5 Tage nach der Injektion.

In allen Versuchen nach Pterininjektion und auch nach Leberpräparaten sahen wir den Beginn des Anstiegs der Retikulozyten spätestens am 5. Tag meistens aber schon am 3. Tag nach der Injektion. Die vollausgebildete Frühkrise trat frühestens am 5. Tag, oft aber auch erst am 7., 10. oder 12. Tag ein.

Die Pterine haben also eine deutlich knochenmarkreizende Wirkung. Über ihre Wirkung bei der perniziösen Anämie ist damit noch nichts ausgesagt. Erst die Erprobung am Perniziosakranken kann darüber Auskunft geben. Dagegen ist zu überlegen, ob nicht die antianämische Leberwirkung bei entbluteten Hunden, die Whipple als Folge von Leberverfütterung sah, auf den Gehalt der Leber an Pterinen zurückzuführen ist. Dabei kommt der Leber bei entsprechender Verarbeitung möglicherweise auch bei der sekundären Anämie eine Wirkung zu.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Pterine machen bei Ratten eine Retikulozytose. Sie sind schon in geringen Dosen wirksam. Auf Pterininjektion erfolgt spätestens innerhalb von 3 bis 5 Tagen der Beginn einer Frühkrise, deren Höhepunkt gewöhnlich am

12. Tag erreicht war. Nach 20 bis 25 Tagen kommt es zu einer Spätkrise. Meist sinken die Erythrozyten- und Hämoglobinwerte gleichzeitig mit der Krise ab, um danach im allgemeinen ihren Ausgangswert zu erreichen.

Die Pterine haben also eine deutliche knochenmarkreizende Wirkung. Der Gehalt der Leber an Pterinen macht eine Wirkung auch bei sekundärer Anämie wahrscheinlich.

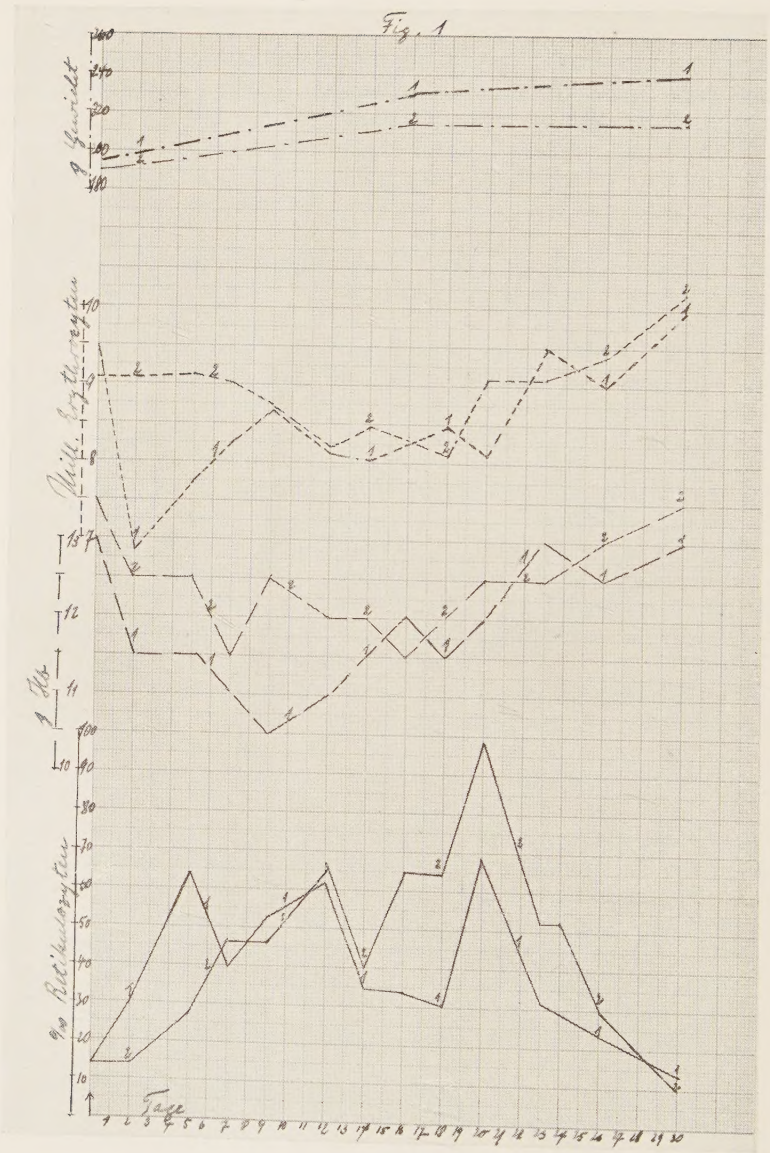
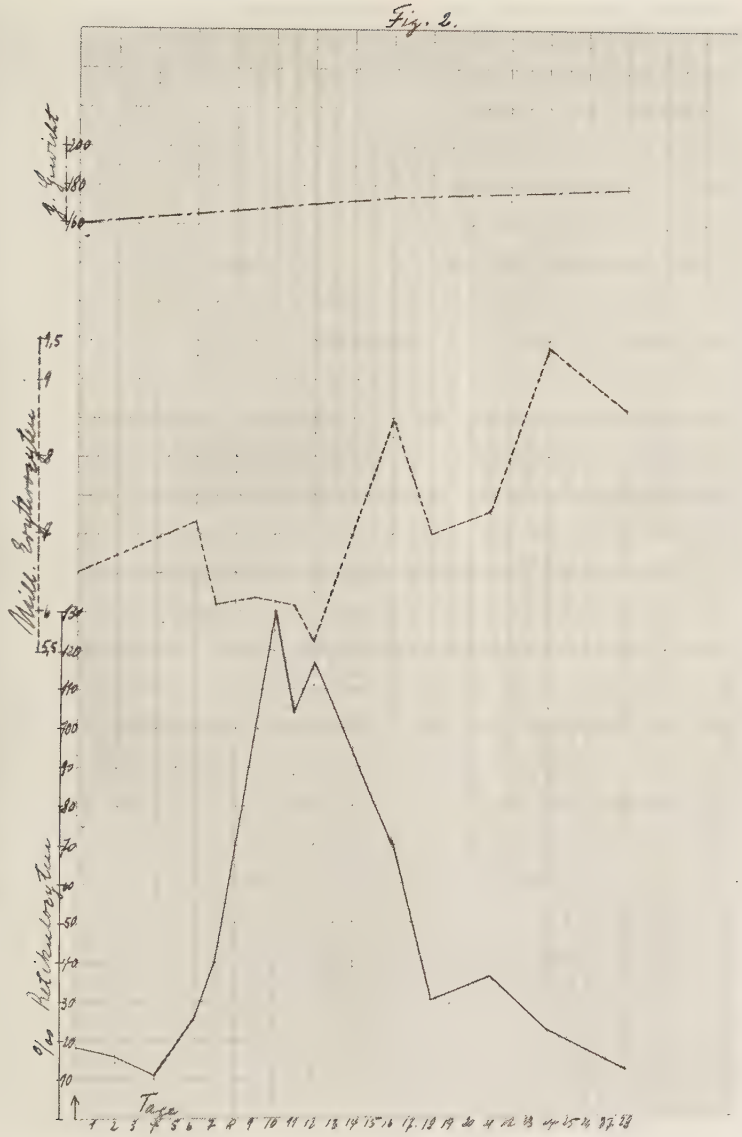


Fig. 1
Tage

Fig. 2.



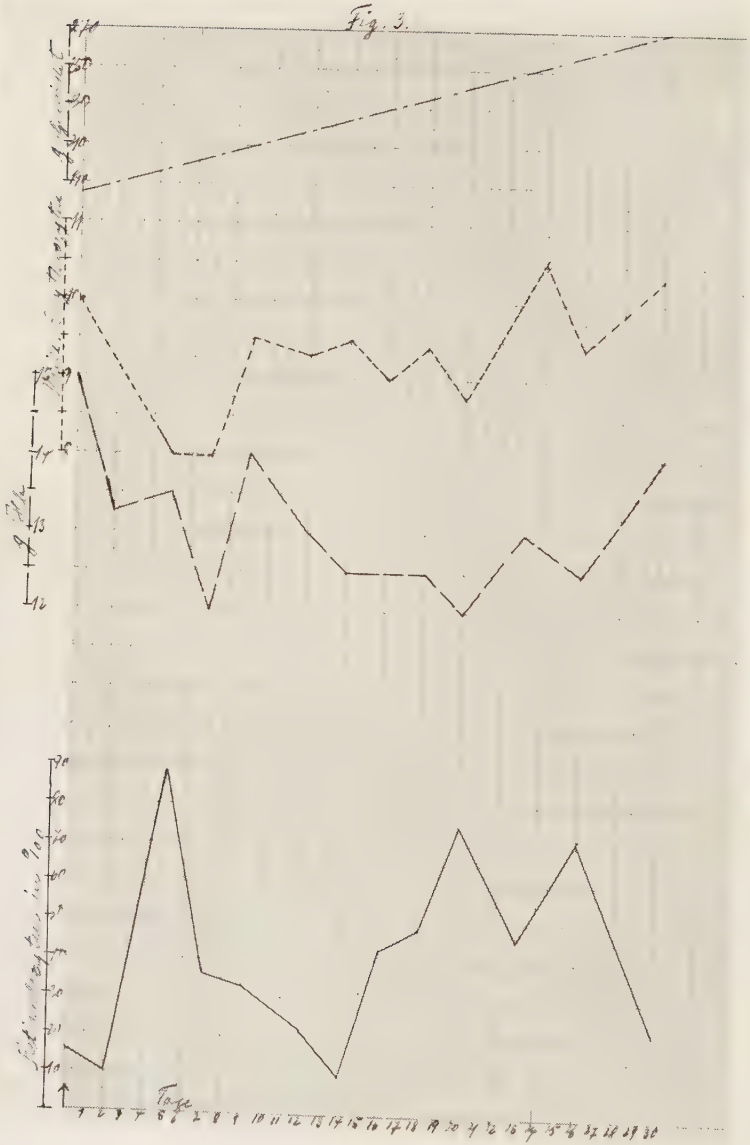


Fig. 3.
Tage

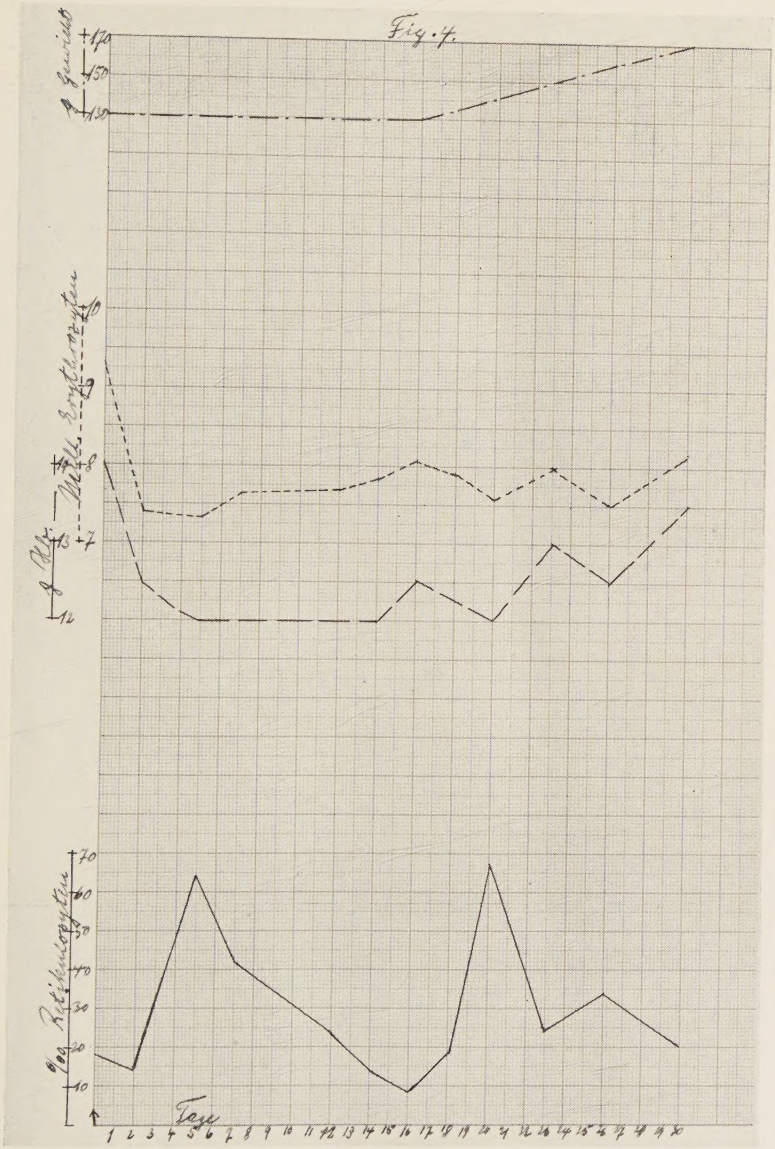


Fig. 4.
g Gewicht
170
150
130
g Hb.
Mittl. Erythrozyten
10
9
8
7
14
13
12
‰ Retikulozyten
70
60
50
40
30
20
10
Tage

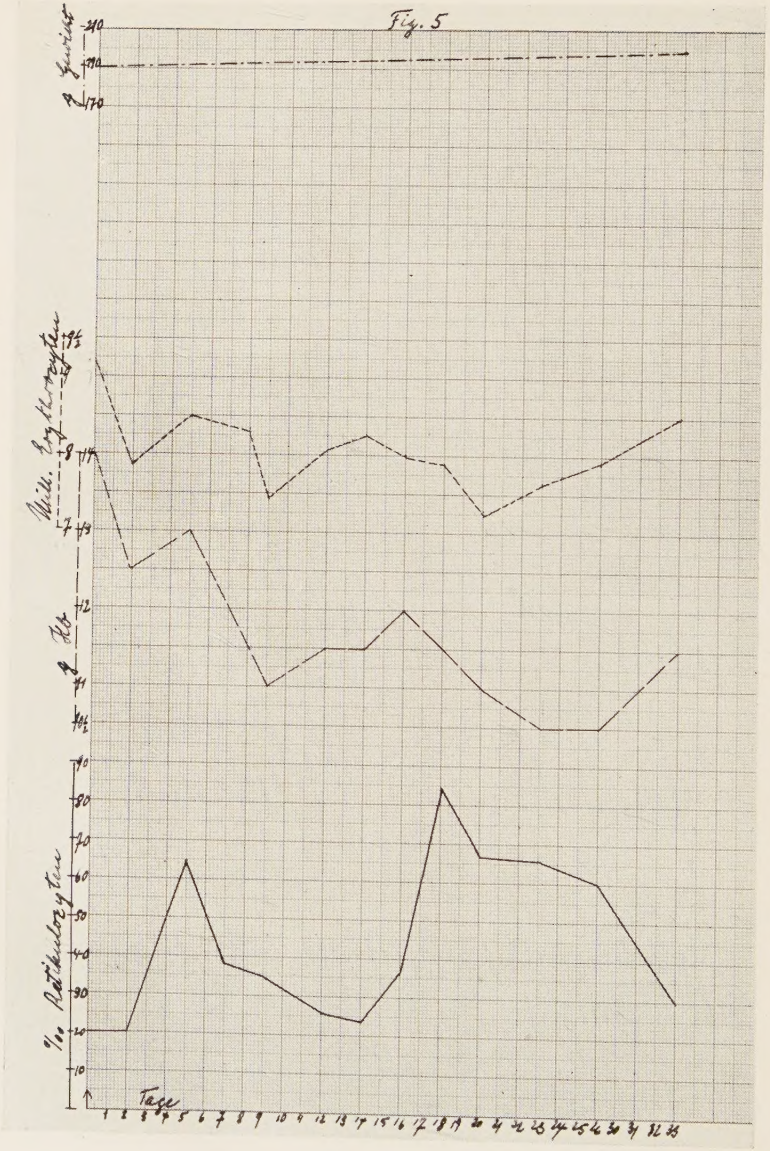


Fig. 5
g Gewicht
Mill. Erythrocyten
g Hb
‰ Retikulocyten
Tage

Schrifttum.

1. Minot u. Murphy: Treatment of pern. anemia by a special diet. J. amer. med. Assoc. 87, 470 (1926).
2. Hansen: Zitiert nach Karl Singer, Physiologie und Pathologie des Antiperniziosaprinzips, Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 47, S. 470 (1934).
3. Morawitz u. Denecke: Blut und Blutkrankheiten. Bergmann Staehelin: Handbuch der inneren Medizin. Berlin, Julius Springer (1926).
4. Singer: Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde. Bd. 47 (1937).
5. Heilmeyer u. R. Westhäuser: Zeitschr. klin. Med. 121/361 (1932).
6. Heilmeyer u. Terven: Zeitschr. experim. Med. 76/220 (1931).
7. Istomanova: Zeitschr. exp. Med. 79/140 (1930).
8. Riddle: American J. of med. Sic. 180/1 (1930).
9. Fontès u. Thivolle: Cr. Acad. Sci. Paris 191/1335 (1930).
10. West u. Hove: Journal of biol. Chemistrie 88/427 (1930).
11. Seyderhelm u. Grebe: Vitamine und Blut (1935).
12. Hans Scheerer: Folia haematologica 56, 4 (1937).
13. Subbarow u. Jakobson: New Engl. J. of Med. 663 (1935).
14. Wieland u. Schöpf: Berl. chem. Ges. 58. 2178 (1925).
15. Koschara: Hoppe Seylers Zeitschr. f. phys. Chemie 240, 127 (1936).
16. Tschesche u. Wolf: Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie 244 (1936).
17. Schöpf u. Becker: Liebigs Ann. 507, 266 (1933).
18. Schöpf u. Becker: Angewandte Chemie 49, 27 (1936).
19. Tschesche u. Wolf: Hoppe Seylers Zeitschr. Nr. 248, S. 34 (1937).
20. Wieland, Metzger, Schöpf u. Bülow: Liebigs Ann. 507, 226 (1933).
21. Singer: Klinische Wochenschrift, I, 200 (1935).

Lebenslauf.

Am 24. Juni 1911 wurde ich in Sudenfeld, einem kleinen Dorfe im Teutoburgerwald, als Sohn des Lehrers Franz Kramer und seiner Ehefrau Bernhardine geb. Lührsen geboren. Kurz vor Beginn des Krieges wurde mein Vater nach Brümsen, einem kleinen Dorfe im Kirchspiel Twistringen, versetzt. Während mein Vater im Felde war, wohnte ich bei meinen Großeltern in Twistringen. In Twistringen habe ich das erste Volksschuljahr absolviert. Dann besuchte ich die Volksschule in Brümsen. Ostern 1927 wurde ich in die Obertertia der Aufbauschule in Diepholz aufgenommen. Dort bestand ich Ostern 1932 die Reifeprüfung.

Die ersten 3 Semester studierte ich in Münster. Danach studierte ich 3 Semester in Göttingen. Das 7. Semester studierte ich in Hamburg und danach wieder 4 Semester in Göttingen.

Als Zeitpunkt für mein medizinisches Staatsexamen habe ich das Sommersemester 1937 vorgesehen.